

УДК 663.087.8:638.1:602(476)

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПЧЕЛ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *BACILLUS SUBTILIS* С РАЗЛИЧНЫМИ БИОДОБАВКАМИ

*И. М. ЛОЙКО¹, А. Г. ЩЕПЕТКОВА¹, Т. М. СКУДНАЯ¹,
Н. В. ХАЛЬКО¹, Л. В. РОМАНОВА², В. А. ЩЕТКО²,
И. И. ГАПОНОВА², О. В. МАКАРЕВИЧ²*

¹*Гродненский государственный аграрный университет,
Гродно, Беларусь,
ggau@ggau.by*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
microbio@mbio.bas-net.by*

Установлено, что использование экспериментальных композиционных составов пробиотической добавки на основе спорообразующих бактерий *B. subtilis* БИМ В-454 Д в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом и в сочетании с пылью позволяет в наибольшей степени нормализовать кишечный биоценоз рабочих пчел после зимовки в сторону снижения количества условно-патогенной микрофлоры и повышения числа лактобактерий, профилактировать у них диарейные заболевания.

Введение. На благополучие пасеки, состояние каждой отдельной пчелосемьи и качество производимой продукции негативно влияет целый комплекс факторов: загрязнение окружающей среды, массовое применение химических пестицидов и гербицидов в растениеводстве, присутствие возбудителей инфекционных и инвазионных болезней, неконтролируемое применение антибактериальных препаратов. Это приводит к снижению резистентности пчел и формированию благоприятных условий для развития инфекционных заболеваний [1, 2]. Кроме того, из-за недостаточного количества медоносов кормовые запасы пчел необходимо периодически пополнять с помощью углеводсодержащих подкормок. Традиционно для этой цели используется 50%-ный сахарный сироп, применение которого способствует

стимулированию физиологической активности пчел [3]. В качестве углеводных подкормок может также использоваться канди на основе сахарозы [4], инулин, фруктоза, мальтоза, левулеза, глюкоза или лигнин. В то же время из-за отсутствия в таких подкормках витаминов, белковых и минеральных веществ при употреблении углеводных сиропов пчелы вынуждены их кондиционировать, т. е. приближать состав и консистенцию к таковым у меда, что приводит к преждевременному износу организма, сокращению продолжительности жизни пчел, плохому развитию глоточных и восковых желез, получению ослабленного расплода [1, 5].

Кроме того, существует особая проблема после зимовки пчелиных семей, так как в желудочно-кишечном тракте рабочих пчел превалирует гнилостная условно-патогенная микрофлора. Ослабленный организм медоносных пчел именно в весенний период нуждается в стимуляции пластических процессов, обеспечивающих нормальное функционирование клеток тканей и органов.

Проведение весенних стимулирующих подкормок пчелиных семей на пасеках – неперемное условие их высокой медовой продуктивности. В этом случае корма должны содержать все необходимые компоненты в пропорции, соответствующей физиологической потребности организма пчелы [6, 7].

В связи с этим целью наших исследований являлась оценка влияния на формирование микробиоценоза кишечного тракта пчел после зимовки различных композиционных составов пробиотической кормовой добавки на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* с биостимулирующими компонентами при использовании их в составе углеводной подкормки.

Объекты и методы исследования. Объектом исследований служили пчелы серой горной кавказской породы, а также образцы различных композиционных составов пробиотической кормовой добавки на основе спорообразующих бактерий *B. subtilis*. Для оценки эффективности композиционных образцов кормовой добавки были сформированы 8 групп по 6 пчелосемей в каждой. Группы пчелиных семей подбирали по принципу пар-аналогов с учетом силы пчелиных семей, количества печатного расплода

и корма, возраста и происхождения маток. Для опыта подбирали пчелосемьи, у которых сила семей составляла 7–10 улочек, количество корма в гнезде – 8 кг, печатного расплода – 140 квадратов, открытого расплода – 126 квадратов. Матки во всех семьях были в возрасте одного года. Все подопытные пчелиные семьи содержались в типовых ульях (рамки размером 435 × 300 мм).

Экспериментальные образцы добавки вводили в гнездо методом скармливания с сахарным сиропом. Подкормку готовили в день применения. Содержимое флакона (1 г сухой пробиотической добавки) смешивали с сахарным сиропом (из расчета на 1 л углеводного корма) и скармливали в дозе 1000 мл сиропа на одну пчелиную семью через каждые 7 сут в период со 2 апреля по 14 мая 2018 г.

Семьи контрольной группы получали только 50%-ный сахарный сироп, в углеводную подкормку пчелосемьям первой опытной группы вводили пробиотическую добавку с сахарозой, пчелам второй опытной группы скармливали пробиотик в сочетании с кобальтом, третьей – пробиотик с дрожжевым экстрактом, четвертая опытная группа пчелосемей получала в составе сахарного сиропа пробиотическую добавку в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом, пчелам пятой опытной группы давали в составе сахарного сиропа пробиотик в сочетании с пыльцой, пчелиные особи шестой опытной группы получали добавку с сухим обезжиренным молоком, пчелосемьи седьмой опытной группы получали пробиотик в сочетании с соевой мукой.

Для определения влияния различных образцов пробиотической добавки на количественный и качественный состав микрофлоры кишечного тракта пчел живых насекомых усыпляли и от 10 особей каждой исследуемой пчелиной семьи извлекали кишечник, который помещали в стерильный бюкс, взвешивали, после чего тщательно гомогенизировали в стерильной фарфоровой ступке в физрастворе в соотношении 1:100 и готовили ряд последовательных 10-кратных разведений на 0,9%-ном растворе хлорида натрия. Из полученных разведений с помощью градуированной пипетки на поверхность хорошо подсушенных селективных питательных сред делали посева в объеме 0,1 мл.

Результаты и обсуждение. Для проведения испытаний эффективности на пчелах подобраны композиционные составы кормовой добавки, включающие пробиотический (сухая биомасса *B. subtilis*), углеводный (сахароза), белковый (дрожжевой экстракт, пыльца, сухое молоко или соевая мука) и иммуностимулирующий (кобальт серноокислый) компоненты. Ранее нами установлено, что все вышеперечисленные биостимулирующие добавки не оказывают негативного влияния на антагонистические свойства *B. subtilis* и могут быть использованы в составе пробиотической кормовой добавки для пчел [4].

Выявлено, что изменения в составе углеводного корма по-разному сказались на микробиологической структуре кишечного биоценоза подопытных пчел. Проведенная сравнительная оценка эффективности использования пробиотической добавки в сочетании с различными биостимуляторами в составе 50%-ного сахарного сиропа пчелиным семьям показала, что использование композиционных составов пробиотического компонента на основе бактерий *B. subtilis* в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом, а также в сочетании с пыльцой позволяет в наибольшей степени нормализовать кишечный биоценоз рабочих пчел после зимовки за счет интенсивного снижения количества условно-патогенной микрофлоры и повышения количества лактобактерий в составе микробиоценоза кишечного тракта пчел (таблица).

Установлено, что в содержимом кишечного тракта пчелиных особей четвертой и пятой опытных групп, получавших пробиотик в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом и пробиотик с пыльцой, численность лактобактерий составила в среднем $6,0 \times 10^7$ и $2,0 \times 10^7$ КОЕ/г соответственно и была выше по сравнению с контрольной группой.

При этом введение данных биостимуляторов в углеводную подкормку позволило замедлить колонизацию кишечного тракта насекомых энтеробактериями и дрожжеподобными грибами.

К концу опыта уровень энтеробактерий у пчел четвертой и пятой опытных групп составил в среднем $4,0 \times 10^6$ и $1,0 \times 10^6$ КОЕ/г соответственно, дрожжеподобных грибов – $1,5 \times 10^7$ и $8,0 \times 10^6$ КОЕ/г соответственно в сравнении с контролем.

Результаты бактериологического исследования кишечного тракта пчел при использовании пробиотического препарата в сочетании с различными биодобавками

Микроорганизмы	Группа насекомых	Количество микроорганизмов в кишечном содержимом пчел, КОЕ/г
Лактобактерии	Контрольная	$8,0 \times 10^6$
	Опытная 1	$2,3 \times 10^7$
	Опытная 2	$1,6 \times 10^7$
	Опытная 3	$1,0 \times 10^7$
	Опытная 4	$6,0 \times 10^7$
	Опытная 5	$2,0 \times 10^7$
	Опытная 6	$6,0 \times 10^6$
	Опытная 7	$4,0 \times 10^6$
Энтеробактерии	Контрольная	$2,2 \times 10^7$
	Опытная 1	$5,0 \times 10^6$
	Опытная 2	$3,5 \times 10^8$
	Опытная 3	$2,5 \times 10^{10}$
	Опытная 4	$4,0 \times 10^6$
	Опытная 5	$1,0 \times 10^6$
	Опытная 6	$1,0 \times 10^8$
	Опытная 7	$3,8 \times 10^8$
Дрожжеподобные грибы	Контрольная	$1,8 \times 10^7$
	Опытная 1	$1,7 \times 10^8$
	Опытная 2	$3,2 \times 10^8$
	Опытная 3	$1,7 \times 10^8$
	Опытная 4	$1,5 \times 10^7$
	Опытная 5	$8,0 \times 10^6$
	Опытная 6	$3,0 \times 10^8$
	Опытная 7	$2,1 \times 10^8$

Полученная картина кишечного микробиоценоза при введении в сахарный сироп экспериментальных композиционных составов, на наш взгляд, представляется наиболее физиологической, поскольку среди микробиоты преобладали кислотопродуцирующие сахаролитические бактерии, которые участвуют в процессах расщепления сахаров, поступающих с пищей, и обеспечивают низкое значение водородного показателя в пищеварительном тракте пчел, что исключает предпосылки для развития поносов.

Как показали результаты бактериологического исследования содержимого кишечного тракта пчелиных особей, при скармливании пробиотической культуры *B. subtilis* в сочетании с пылью и в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом условно-патогенные для медоносных пчел энтеробактерии, относящиеся к родам *Hafnia*, *Citrobacter*, не выделялись.

В ходе опыта у пчелиных особей первой, второй и третьей опытных групп, получавших пробиотик в сочетании с сахарозой, кобальтом, дрожжевым экстрактом, также наблюдалось закономерное увеличение количества лактобактерий ($2,3 \times 10^7$; $1,6 \times 10^7$ и $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г соответственно) в сравнении с контролем. Однако фоновое значение энтеробактерий и дрожжеподобных грибов у пчел названных ранее опытных групп определялось на более высоком уровне по сравнению с насекомыми контрольной группы. Энтеробактерии, изолированные из кишечного тракта пчел данных опытных групп, были представлены родами *Hafnia* и *Citrobacter*.

В ходе испытаний установлено, что скармливание пчелам пробиотического компонента в сочетании с сухим обезжиренным молоком и в комплексе с соевой мукой в составе сахарного сиропа привело к повышению количества условно-патогенной микрофлоры и снижению уровня лактобактерий. Бактериологические исследования кишечного тракта пчел показали, что концентрация лактобактерий у пчелиных особей шестой и седьмой опытных групп составила $6,0 \times 10^6$ и $4,0 \times 10^6$ КОЕ/г соответственно и была ниже контрольного уровня. Количество энтеробактерий на фоне введения данных экспериментальных препаратов составила в среднем $1,0 \times 10^8$ и $3,8 \times 10^8$ КОЕ/г соответственно, дрожжеподобных грибов – $3,0 \times 10^8$ и $2,1 \times 10^8$ КОЕ/г соответственно, что значительно превысило аналогичный показатель у пчелиных особей контрольной группы. При этом в посевах преобладали энтеробактерии рода *Klebsiella*. Эти же бактерии выделялись и в содержимом кишечного тракта пчел контрольной и четвертой опытной групп. Частое обнаружение клебсиелл не свидетельствует о наличии заболевания, но позволяет предположить их физиологическую роль, связанную со способностью активно утилизировать сахарозу [4]. Однако при исчезновении

естественных антагонистов возбудителей инфекционного процесса они способны индуцировать развитие заболевания.

В ходе исследований установлено, что пчелиные особи, получавшие пробиотический препарат с сухим обезжиренным молоком и пробиотик в сочетании с соевой мукой, испытывали дискомфорт, проявляющийся в излишнем возбуждении и диспепсических расстройствах. В связи с этим можно заключить, что использование данных экспериментальных составов в качестве весенних побудительных подкормок неэффективно, так как приводит к нарушению физиологического равновесия в пчелиных семьях и развитию дисфункции пищеварительного тракта насекомых вплоть до выраженных анатомических дефектов. Кроме того, поедаемость пчелами кормов с данными белковыми наполнителями была в два раза меньше по сравнению с другими экспериментальными добавками. Следовательно, можно констатировать, что такие корма недостаточно привлекательны для пчел.

Таким образом, проведенные исследования показали, что использование экспериментальных композиционных составов пробиотической добавки на основе спорообразующих бактерий *B. subtilis* БИМ В-454 Д в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом (образец 4) и в сочетании с пылью (образец 5) позволяет в наибольшей степени нормализовать кишечный биоценоз рабочих пчел после зимовки в сторону снижения количества условно-патогенной микрофлоры и повышения числа лактобактерий, профилактировать у них диарейные заболевания. Однако в связи с тем, что использование пыли, в отличие от дрожжевого экстракта, требует особых условий хранения ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$), во избежание потери ею полезных свойств, а также по причине значительной вариабельности состава пыли в зависимости от производителя наиболее предпочтительным является применение пробиотика в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом.

По результатам проведенных испытаний утверждён композиционный состав пробиотической кормовой добавки для пчел «Апипро» (г/г): сухая биомасса *B. subtilis* – 0,1; дрожжевой экстракт – 0,9; кобальт сернокислый – 0,008.

Биологическая активность кормовой добавки «Апипро» обусловлена наличием в ее составе пробиотических бактерий *B. subtilis*, характеризующихся высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам – возбудителям желудочно-кишечных заболеваний пчел. Бактерии продуцируют витамины и ферменты, что обеспечивает быстрое восстановление и поддержание нормального микробиоценоза кишечника, стимуляцию иммунитета, активизацию окислительно-восстановительных и обменных процессов в организме пчел. Входящий в состав кормовой добавки дрожжевой экстракт является дополнительным источником белка, что особенно важно для обеспечения развития пчелиных семей поле зимовки. Оптимальная доза сульфата кобальта способствует повышению яйценоскости пчелиных маток.

Заключение. Использование экспериментальных композиционных составов пробиотической добавки на основе спорообразующих бактерий *B. subtilis* в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом и в сочетании с пылью в составе углеводной подкормки позволяет в наибольшей степени нормализовать кишечный биоценоз рабочих пчел после зимовки в сторону снижения количества условно-патогенной микрофлоры и повышения числа лактобактерий, профилактировать у них диарейные заболевания. Однако в связи с тем, что использование пыли, в отличие от дрожжевого экстракта, требует особых условий хранения ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$), во избежание потери ею полезных свойств, а также по причине значительной вариабельности состава пыли в зависимости от производителя наиболее предпочтительным является дальнейшее применение пробиотика в комплексе с кобальтом и дрожжевым экстрактом.

Литература

1. Аветисян, Г. А. Пчеловодство / Г. А. Аветисян, Ю. А. Черевко. – М. : Академия, 2001. – 320 с.
2. Афанасьева, Е. Ю. Современное состояние и проблемы развития пчеловодства в Республике Беларусь / Е. Ю. Афанасьева. – Минск : БГЭУ, 2013. – Т. 1. – С. 326–327.
3. Африкян, Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение / Э. К. Африкян. – Ереван : Изд-во АН Армянской ССР, 1973. – 362 с.

4. Определение токсического действия пробиотических препаратов на основе молочнокислых, бифидо- и спорообразующих бактерий для медоносных пчел / Н. В. Халько [и др.] // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сб. науч. ст. по материалам XXI Междунар. науч.-практ. конф. / Гродн. гос. аграр. ун-т. – Гродно, 2018. – С. 100–102.

5. Бармина, И. Э. Стимулирующие подкормки для пчелиных семей с добавлением комплексных аминокислотных и пробиотических препаратов / И. Э. Бармина, А. Г. Маннапов, Г. В. Карпова // Вестн. ОГУ. – 2011. – №12 (131). – С. 376–377.

6. Показатели зимовки рабочих пчел на фоне использования пробиотических препаратов / И. М. Лойко [и др.] // Сел. хоз-во – проблемы и перспективы. – Гродно, 2018 – Т. 40. – С. 115–121.

7. Перспективы использования пробиотиков в пчеловодстве / И. М. Лойко [и др.] // Белар. пчаляр: науч.-производств. журн. – 2018. – № 3 (47) – С. 40–43.

**EFFECT OF PROBIOTIC PREPARATION BASED
ON *BACILLUS SUBTILIS* AND FORTIFIED WITH VARIOUS
BIOSUPPLEMENTS ON GASTROINTESTINAL
MICROBIOCENOSIS OF BEES**

*I. M. LOIKO¹, A. G. SHCHEPETKOVA¹, T. M. SKUDNAYA¹,
N. V. HALKO¹, L. V. ROMANOVA², V. A. SHCHATKO²,
I. I. GAPONOVA², O. V. MAKAREVICH²*

*¹Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus,
ggau@ggau.by*

*²Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus,
microbio@mbio.bas-net.by*

It was established that application of probiotic composition based on spore-forming bacteria *B. subtilis* BIM B-454 D in combination with cobalt and yeast extract or supplemented with pollen enables to normalize intestinal microbiocenosis of working bees after winter season by decreasing the ratio of opportunistic species and increasing the proportion of lactic acid bacteria, preventing thereby diarrhea cases.

Поступила в редакцию 15.04.2019